



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

دانشکده پزشکی

پایان نامه دوره دکتری حرفه ای پزشکی

عنوان :

بررسی اثر گیاه استویا بر میزان سرمی امنیتن در رت های دیابتی شده با STZ

دانشجو :

اعظم صحرا پور

استاد راهنما :

دکتر صمد اکبرزاده

دانشیار گروه بیوشیمی

اساتید مشاور :

دکتر افشار بارگاهی

استادیار گروه بیوشیمی

دکتر علیرضا رهبر

استادیار گروه تغذیه

این طرح با تصویب و حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر اجرا

گردیده است

۱۳۹۲

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده	۱
روش کار	۱
نتایج	۲
کلیات	۳
بیان مساله	۹
اهداف اصلی	۱۰
اهداف فرعی طرح	۱۰
مروری بر متون	۱۰
روش کار	۱۳
نحوه ایجاد دیابت در حیوانات	۱۴
نحوه آماده سازی عصاره آبی استویا	۱۵
نحوه انجام مداخله	۱۶
نحوه نمونه گیری	۱۶
آزمایش بیوشیمیایی	۱۷
رفرنس	۲۹

چکیده

هدف:

با توجه به شیوع روز افزون بیماری دیابت، تا جایی که حدود ۶ درصد جمعیت بالغ دنیا را به خود درگیر کرده است و اهمیت پیشگیری و کنترل این بیماری، نیاز به شیرین کننده های کم کالری و البته طبیعی بیش از پیش احساس می شود. در این مطالعه سعی شده است به بررسی تاثیر گیاه استویا که یکی از شیرین کننده های طبیعی است، بر میزان سرمی امتین پرداخته شود. امتین یک آدیپوکاین است که توسط بافت چربی ساخته میشود. مطالعات اخیر نشان داده اند که امتین در افراد چاق و مقاوم به انسولین کاهش می یابد با توجه به ضرورت استفاده از قند های کم کالری، نیاز است که پارامتر های عمده ای که ارتباط تنگاتنگ با دیابت دارند هنگام مصرف این محصولات مورد سنجش و ارزیابی قرار گیرند. یکی از این پارامترها امتین است که با توجه به ارتباط نزدیک آن با دیابت، ضرورت دارد که متعاقب حتی قند های کم کالری نیز این پارامتر سنجش شود.

روش کار:

در ابتدا ۴۰ رت در محدوده وزنی ۱۸۰-۲۵۰ گرم انتخاب شدند و به طور تصادفی به پنج گروه هشت تایی تقسیم شدند. بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی به ۴ گروه از رت ها استرپتوزوتوسین به صورت داخل صفاقی تزریق شد و یک گروه نیز به عنوان کنترل غیر دیابتی در نظر گرفته شد. بعد از ۵ روز خون رت ها در شرایط ۱۲ ساعت ناشتایی گرفته شد و معیار دیابتی بودن آن ها قند خون بالای ۳۰۰ در نظر گرفته شد. عصاره گیاه استویا به مدت ۳۰ روز با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به گروه سوم، ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به گروه چهارم و ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به گروه پنجم داده شد.

بعد از ۳۰ روز در شرایط ۱۲ ساعت ناشتایی، رت ها با ایزوفلوران تنفسی بیهوش شدند و نمونه خون آن ها برای جدا کردن سرم و اندازه گیری سطح سرمی امتین، گلوکز، انسولین، آکالین فسفاتاز و پارامترهای لیپیدی

گرفته شد. بیوپسی کبد و پانکراس نیز برای بررسی تغییرات سلول های بتای پانکراس و تغییرات کبدی ناشی از گیاه استویا گرفته شد و با میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

نتایج

در پایان مطالعه کاهش قابل ملاحظه ای در قند خون، اندکس مقاومت انسولین، سطح سرمی تری گلیسیرید، امتنین و آکالین فسفاتاز در گروه سوم و چهارم در مقایسه با گروه دوم دیده شد. در گروه پنجم تغییری در پارامترهای اندازه گیری شده نسبت به دیگر گروه ها یافت نشد. غلظت انسولین، کلسترول و شاخص فعالیت سلول های بتا ($HOMA_B$) تفاوت قابل ملاحظه ای در بین گروه های مورد مطالعه نداشت. در بیوپسی پانکراس تغییری در سلول های بتای پانکراس در گروه های مورد مطالعه یافت نشد. در بررسی هیستوپاتولوژیک کبد شواهد تخریب بافت کبد، ناشی از دریافت استویا یافت نشد.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه نتیجه گرفته شد که تجویز گیاه استویا به طور غیر مستقیم از طریق افزایش حساسیت به انسولین و کاهش گلوکز خون، باعث کاهش سطح امتنین سرم می شود. گیاه استویا در کاهش سطح تری گلیسیرید سرم موثر است و اثر حفاظت کننده روی کبد نیز دارد. کلمات کلیدی گیاه استویا، امتنین، دیابت

فصل اول

کلیات

دیابت شیرین شامل گروهی از اختلالات متابولیک شایع است. اختلال تنظیم متابولیسم ناشی از دیابت شیرین سبب بروز تغییرات پاتوفیزیولوژیک ثانویه ای در اندام های متعدد بدن میشود که مشکلات فراوانی را برای فرد مبتلا به دیابت و دستگاه بهداشتی جامعه به همراه می آورد.

با افزایش بروز دیابت شیرین در سراسر جهان انتظار میرود که این بیماری همچنان یکی از علل اصلی بیماری زایی و مرگ و میر باقی بماند (۱) پس جلوگیری از پیشرفت دیابت یک بحث مهم در قرن ۲۱ است. (۲) در بیماران دیابتی افزایش مزمن در غلظت گلوکز خون باعث مقاومت به انسولین و عوارض مشخص بیماری دیابت مثل بیماری عروق کرونر، هایپرنتشن، نارسایی کلیوی و اختلال در لیپیدهای سرم میشود. (۱) تصور می شود انواع مختلف مواد هایپوگلیسمیک خوراکی همراه با انسولین برای درمان دیابت شیرین وجود دارد. با این وجود درمان با داروهای کاهنده قند خون رضایت بخش نیست. داروهایی نظیر بیگوانیدها (biguanides) و سولفونیل اوره ها (sulfonylureas) در حال حاضر برای کاهش هایپرگلیسمی در دیابت بکار می روند. این داروها عوارض جانبی داشته و هنوز مدیریت دیابت بدون هرگونه عوارض جانبی یک چالش در جامعه پزشکی است، بنابراین جستجوی رده جدیدی از ترکیبات نقش اساسی را در برطرف سازی مشکلات افراد دیابتی دارد (۳)

بیماران دیابتی و افراد در معرض آن نقش مهمی در کنترل بیماری خود دارند به طوری که تغذیه و رژیم غذایی مناسب یکی از شروط اساسی کنترل موفق بیماری است. (۴) با توجه به آثار مخرب شکر در افراد دیابتی و لزوم پرهیز از مصرف آن، شیرین کننده های مصنوعی و کم کالری مانند آسپارتام و ساکارین به بازار جهانی عرضه شدند. اما ثابت شده است که عوارض این شیرین کننده های مصنوعی بیشتر از فواید درمانی آن هاست. (۵) به دلیل تمایل بالای مصرف محصولات قندی در جهان، ضرورت تولید محصولاتی با عدم قابلیت جذب و با قابلیت جذب کم مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از شیرین کننده های طبیعی به ویژه اگر افراد

مبتلا به دیابت نیز بتوانند از آن ها استفاده نمایند اهمیت زیادی پیدا کرده است. گیاهانی که در طب سنتی برای درمان دیابت مورد استفاده قرار می گرفتند تبدیل به منبعی از ترکیبات خوراکی ضد دیابت جدید شده است. سازمان بهداشت جهانی تحقیقاتی را پیشنهاد کرد که بر پایه روش های سنتی درمان دیابت استوار بودند (۶) برای درمان دیابت به خصوص در کشور های شرقی، علاوه بر محدودیت دریافت کالری و ورزش، استفاده از گیاهان دارویی نیز نقش مهمی دارد. این ترکیبات برای مدیریت درمان دیابت در چندین قسمت ایران استفاده شده است. (۷)

در نهایت کشف فاکتورهای ضد دیابتی با منبع طبیعی موضوع تحقیقات بسیاری شده است.

یکی از گیاهانی که در این خصوص مورد توجه است گیاه استویا است. گیاه استویا نخستین بار در شمال پاراگوئه شناخته شد. این گیاه بومی نواحی شمال آمریکای جنوبی است و بطور وحشی در سرزمین های بلد ناطق مرزی بین برزیل و پاراگوئه میروید و در آن مناطق به گیاه برگ عسلی معروف است و توسط برتونی برای اولین بار به اروپا آورده شد (۸).

عوامل گلیکوزیدی که دارای ساختار دی ترین میباشند و در ایجاد طعم شیرین استویا موثر میباشند به قرار ذیل است:

Stevioside

Rebaudioside A

Dulcidoside

گیاه استویا حدود ۳۰۰ بار از سوکروز شیرین تر است (۵) و برخلاف آن روی میزان قند خون تاثیر ندارد، (۹، ۱۰) و فاقد کالری می باشد (۱۱) بررسی صورت گرفته در سال ۲۰۱۰ نشان داد استفاده از استویا و یا عصاره شیرین آن هیچ عارضه جانبی بر سلامتی انسان ندارند (۱۲، ۱۳)، همچنین در مطالعه ای که بر روی افراد

دچار هایپرلیپیدمی انجام شده مصرف گیاه استویا چربی خون این افراد را کاهش داده است (14). خواص ضد میکروبی (15، 16) و ضد التهابی گیاه استویا (14) نیز مورد تأیید واقع شده است.

عصاره خشک برگهای گیاه *S. raubudiana* نیز حاوی فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، کلروفیل ها و گزانتوفیل های محلول در آب، اسیدهای هیدروکسی سینامیک، الیگوساکاریدهای خنثی محلول در آب، قندهای آزاد، آمینو اسیدها، لیپیدها و روغن های اساسی هستند (17). تحقیقات اخیر نشان داده است استویزوئید (یک دی ترپن گلیکوزیدی که در گیاه *Stevia rebaudiana* وجود دارد) اثرات محرک ترشح انسولین را در آیسلت های ایزوله موش و خطوط کلنی سلول های بتا را نشان میدهد (18، 19) و دارای اثرات محرکه انسولین، تثبیت کننده گلوکاگن و ضد هایپرگلیسمی در حیوانات دیابتی است (20، 21). تحقیقات chen (22) و همکارانش نشان داد استویزوئید پس از تیمار رتها با استرپتوزوتوسین (همانند آلوکسان موجب تخریب سلولهای بتای پانکراس می شود) موجب کاهش هایپرگلیسمی می شود.

تحقیقات Junbi و همکارانش نشان داد رژیم های غذایی حاوی پروتئین گلوتن همراه با استویا با کاهش مقادیر گلوکز، کلسترول LDL و تری اسیل گلیسرول موجب معکوس شدن اثرات دیابت می شوند و به عنوان یک کاندیدای مهم در بهبود مشکلات ناشی از دیابت ملاحظه می شوند (23).

تاکنون مکانیسم عمل استویزوئید بطور کامل توجیه نشده است. تصور می شود مصرف خوراکی آن موجب افزایش حساسیت سلول های موش های صحرایی مقاوم به انسولین شده و اثرات ضدهایپرگلیسمی، محرک انسولین و، تثبیت کننده گلوکاگن را در رتهای دارای دیابت نوع ۲ اعمال میکند (24، 25) که در این میان اثرات محرک انسولین اصلی ترین ویژگی آن محسوب می شود. استویزوئید موجب افزایش مصرف گلوکز در سلولهای بافت عضله شده و گلوکونئوز کبدی را کاهش می دهد (26، 27). با وجود اختلاف نظرهایی که در زمینه مکانیسم عمل استویزوئید وجود دارد، اکثر محققان معتقدند استویزوئید میزان گلوکز خون را به حد

طبیعی می رساند (۲۸). بررسی های متعدد نشان دادند ترکیبات استویا موجب کاهش معنادار قند در دیابتی ها می شوند (۲۹).

توجه به نقش امتین در بیماری دیابت، در تحقیق کنونی سعی بر آن شده تا ضمن بررسی اثرات عصاره استویا بر پروفایل های قندی و لیپیدی، تغییرات میزان سرمی امتین در موش های صحرایی دیابتی دریافت کننده استویا نیز مورد بررسی قرار بگیرد.

هایپرگلیسمی از طریق اتو اکسیداسیون گلوکز موجب افزایش تولید رادیکالهای آزاد می شود که به تخریب سلول های کبدی منجر می شود. افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن در دیابتی ها می تواند اولاً به علت افزایش مقادیر گلوکز خون و ثانیاً به دلیل اثرات داروهای دیابت زا نظیر استرپتوزوتوسین باشد (۳۰). عصاره استویا اثرات آنتی اکسیدانی و خشی کنندگی رادیکال آزاد را نشان می دهند و اثرات محافظتی را بر عملکرد تخریبی رادیکال های هیدروکسیل در DNA اعمال می کنند (۳۱، ۳۲). بنابراین خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات عصاره استویا می تواند عامل تاثیرات هایپوگلیسمیک آن باشند.

به دلیل خاصیت شیرین کنندگی و درمانی گیاه استویا، این گیاه به شدت از نظر اقتصادی و علمی مورد توجه قرار گرفته است و استفاده از ترکیبات حاوی استویا به دلیل نقش آن در حفظ سلامتی و کنترل دیابت به طور گسترده در حال افزایش است تا میل به خوردن مواد شیرین را نیز در بیماران دیابتی پاسخ گو باشد.

گیاه استویا هم اکنون در شمال کشور به خصوص استان گیلان پرورش داده میشود و در چندین قسمت ایران برای مدیریت درمان دیابت استفاده میشود. (۷)

بافت چربی به عنوان یک ارگان آندوکراین فعال عمل می کند که علاوه بر هموستاز انرژی و ذخیره چربی، تعداد زیادی میانجی های فعال به نام آدیپوکاین ها را آزاد می کند که نقش مهمی در هموستاز انرژی، فشارخون، قند خون و پروفایل لیپید دارند. (۳۳) در ده سال گذشته بیش از پنجاه نوع آدیپوکاین با رویکردهای ژنتیکی متفاوت شناخته شده است. آدیپوکاینها ساختارهای پروتئینی و عملکردهای فیزیولوژیک بسیار گوناگونی

دارند که شامل هورمون های متابولیک (مانند لپتین آدیپونکتین)، سایتوکاینها و کموکاین های کلاسیک (مانند فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین ۶)، فاکتورهای رشد (مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروق) و پروتئین های متصل به لیپید کوچک (مانند رتینول بایندینگ پروتئین ۴ یا RBP4) هستند. (34) آدیپوکاین ها اثرات فیزیولوژیک متفاوتی بر اندام های مختلفی همچون مغز، استخوان، اندام های تولید مثلی، کبد عضله اسکلتی، سلول های ایمنی و عروق خونی دارند. (34) به نظر میرسد که آدیپوکاین ها، نقش مهمی در پاتوژنز مقاومت به انسولین، دیابت و آترواسکلروز داشته باشند. (35) یکی از آدیپوکاین هایی که توسط بافت چربی ساخته میشود امتنن است، که اثر گسترده ای روی متابولیسم کربوهیدرات ها و لیپید ها دارد. امتنن عمدتاً توسط چربی احشایی ساخته میشود و از آنجا که ثابت شده است دیابت نوع ۲ بیشتر با چاقی شکمی ارتباط دارد، ممکن است کاهش امتنن سرم در مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ نقش داشته باشد. (16) مطالعات اخیر نشان داده اند که امتنن سرم در زنان چاق و بیماران دیابت نوع ۲ کاهش داشته

است. (36) کاهش در میزان امتنن سرم در دیابت نوع ۱ هم گزارش شده است. (37) همچنین بیان ژن امتنن در چاقی و مقاومت به انسولین و دیابت کاهش می یابد پس سطح امتنن سرم در این موارد کاهش دارد. (16)

امتنن باعث افزایش برداشت گلوکز وابسته به انسولین و Akt فسفوریلاسیون در بافت چربی میشود و به این دلیل به نظر میرسد که امتنن باعث بهبود حساسیت به انسولین میشود. ممکن است امتنن نقش تنظیم کننده در فعالیت انسولین نیز داشته باشد (37)

بیان مسئله

دیابت شیرین شامل گروهی از اختلالات متابولیک است که تغییرات پاتوفیزیولوژیک ثانویه ناشی از آن، باعث مشکلات فراوانی برای فرد مبتلا به دیابت و دستگاه بهداشتی جامعه میشود. (۱)

با توجه به شیوع روز افزون بیماری دیابت در سراسر جهان، جلوگیری از پیشرفت آن به عنوان یک بحث مهم در قرن ۲۱ مطرح شده است. (۲)

تغذیه و رژیم غذایی یک شرط اساسی برای کنترل موفق بیماری دیابت است. (۳) با توجه به آثار مخرب شکر در افراد دیابتی و لزوم پرهیز از مصرف آن، شیرین کننده های مصنوعی و کم کالری مثل اسپارتام و ساکارین به بازار جهانی عرضه شدند. ولی ثابت شده است که عوارض این شیرین کننده های مصنوعی بیشتر از فواید آنهاست (۴) بنابراین تولید محصولاتی با شیرین کننده های با جذب کم و یا با عدم قابلیت جذب مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این شیرین کننده های طبیعی گیاه استویا است که ۳۰۰ بار شیرین تر از سوکروز است (۵)، فاقد کالری است (۱۱) و از طرفی باعث کاهش قند خون نیز میشود. (۹، ۱۰) امتتین یک آدیپوکاین جدید است که عمدتاً توسط بافت چربی احشایی ساخته میشود. امتتین باعث افزایش برداشت گلوکز وابسته به انسولین و Akt فسفوریلاسیون در بافت چربی میشود و به این دلیل به نظر میرسد که امتتین باعث بهبود حساسیت به انسولین میشود. ممکن است امتتین نقش تنظیم کننده در فعالیت انسولین نیز داشته باشد (۳۸)

در چندین مطالعه به کاهش سطح امتتین سرم در بیماران چاق و دیابتی اشاره شده است (۳۵) با توجه به ضرورت استفاده از قند های کم کالری در افراد دیابتی و با توجه به اینکه آدیپوکاین ها در ارتباط تنگاتنگ با تخفیف و شدت دیابت هستند، طراحی ارتباط بین مصرف گیاه استویا و اندازه گیری پارامترهایی مثل امتتین در رت های دیابتی مورد نیاز است.

اهداف اصلی

۱. بررسی تاثیر گیاه استویا بر روی میزان سرمی امتنن در رت های دیابتی شده با STZ

اهداف فرعی طرح

۱. بررسی ارتباط بین سطح سرمی امتنن با شاخص مقاومت انسولینی متعاقب مصرف گیاه استویا
 ۲. بررسی ارتباط سطح سرمی امتنن با پارامترهای لیپیدی و لیپوپروتئینی متعاقب مصرف گیاه استویا
- اهداف کاربردی شناخت بیشتر اثرات گیاه استویا جهت استفاده افراد دیابتی از آن به عنوان شیرین کننده با اطمینان بیشتر فرضیات یا سوالات پژوهش با توجه به اهداف طرح: آیا استفاده از عصاره گیاه استویا در رت های دیابتی تاثیری بر میزان سرمی امتنن دارد؟

اهداف کاربردی :

شناخت بیشتر اثرات و عوارض مصرف گیاه استویا ، برای استفاده مطمئن تر از آن در افراد دیابتی و در

صنایع غذایی

فصل دوم

مروری بر متون:

۱. در مطالعه ای که توسط Shivanna N و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد ۸۰ رت تحت آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاکی از کاهش گلوکز خون و آنزیم های کبدی و افزایش میزان انسولین در حیوانات تحت آزمایش با عصاره کامل استویا و عصاره پلی فنولی استویا بود. استویا همچنین باعث کاهش غلظت MDA در کبد و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی از طریق آنزیم های آنتی اکسیدانی می گردد. تحمل گلوکز و حساسیت نسبت به انسولین در حیوانات مصرف کننده استویا افزایش یافته بود.

از طرفی با وجود شواهدی مبنی بر اثرات مخرب استرپتوزوسین بر عملکرد کلیوی و کبدی موش ها، این عوارض مخرب در حیوانات تحت درمان با عصاره برگ استویا و گروه مصرف کننده عصاره پلی فنولی استویا به صورت معناداری کمتر بود. (39)

۲. در مطالعه ای دیگر که در سال ۲۰۱۱ توسط Misra H و همکاران بر روی تعدادی رت از نژاد ویستار که با آلوکسان دیابتیک شده بودند نشان داده شد که عصاره برگ گیاه استویا باعث کاهش آهسته ولی معنادار میزان گلوکز خون بدون ایجاد هایپوگلیسمی گردید.

از طرفی مصرف استویا باعث کم شدن میزان کاهش وزن در مقایسه با رت های تحت آزمایش با داروی گلی بن کلامید شد. همچنین نتایج حاکی از اثرات آنتاگونیستی استویا نسبت به آلوکسان در جهت کم شدن نکروز سلول های بتا پانکراس و در نتیجه اثرات احیا کننده عصاره برگ این گیاه بود. (40)

طی مطالعه Nunes AP و همکاران در سال ۲۰۰۷ در جهت شناسایی امکان وجود اثرات مخرب و ژنوتوکسیک استویا بر روی سلول های یوکاریوتی نشان داده شد که مصرف عصاره برگ گیاه استویا منجر به ایجاد ضایعاتی بر روی سلول های محیطی خون، کبد، مغز و طحال در سطوح مختلف می گردد که بیشترین اثرات تخریبی در سلول های کبد دیده شد. این محققان بر اثرات احتمالی موتاژنیک عصاره استویا هشدار داده اند. (41)

۴. در مطالعه ای که توسط Gregersen S و همکاران در سال ۲۰۰۴ جهت بررسی اثرات حاد استفاده از استویا در بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ به منظور بررسی احتمال کاهش گلوکز خون بعد از غذا صورت گرفت چنین بیان شده که ایندکس انسولینوژنیک (نسبت انسولین به گلوکز) حدود ۴۰ درصد در گروه استفاده کنندگان از استویا نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. از طرفی استویا منجر به کم شدن سطح گلوکاگون گردید در حالی که تغییر معناداری در میزان انسولین، پپتید شبه گلوکاگون ۱ و پلی پپتید انسولینوتروپیک وابسته به گلوکز ایجاد نکرد.

به طور خلاصه در این پژوهش بیان گردید که استویا سطح گلوکز خون بعد از غذا را در بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ کاهش می دهد که نشان دهنده اثرات مثبت عصاره ای گیاه بر متابولیسم گلوکز است و ممکن است مزایایی در درمان بیماران مبتلا به دیابت تیپ ۲ داشته باشد. (42)

۵. در مطالعه ای که توسط Yilmaz Y و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد ۱۷۴ بیمار تحت آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاکی از بالاتر بودن سطح امتنین در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی بود. میزان امتنین سرم با CRP و درجه تورم هپاتوسیت ها ارتباط معناداری داشت. به طور کلی در این مطالعه به این مسئله تاکید شده است که سطح سرمی امتنین سرم در بیماران مبتلا به کبد چرب غیر الکلی افزایش می یابد و به عنوان یک پیشگوی مستقل جهت میزان کلی تورم هپاتوسیت ها مطرح است. (43)